

10/070569

PCT/JP00/06147

日 本 国 特 許 庁 27.09.00

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JP00/6147

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年12月 3日

REC'D 17 NOV 2000

WIPO

PCT

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第345404号

出 願 人

Applicant (s):

明治乳業株式会社
村松 喬

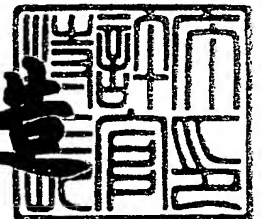
4

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2000年11月 6日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特 2000-3090027

【書類名】 特許願

【整理番号】 P99021

【提出日】 平成11年12月 3日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

【住所又は居所】 福岡県北九州市八幡西区青山 3 - 1 8 - 1 3 - 5 0 2

【氏名】 岡本 好司

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田 5 4 0 番地 明治乳業株式会社細胞工学センター内

【氏名】 池松 真也

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田 5 4 0 番地 明治乳業株式会社細胞工学センター内

【氏名】 小田 宗宏

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田 5 4 0 番地 明治乳業株式会社細胞工学センター内

【氏名】 熊井 英志

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田 5 4 0 番地 明治乳業株式会社細胞工学センター内

【氏名】 佐久間 貞俊

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市天白区天白町大字平針字黒石 2 8 4 5 - 1 6 1

【氏名】 村松 喬

【特許出願人】

【識別番号】 000006138

【氏名又は名称】 明治乳業株式会社

【代表者】 中山悠

【特許出願人】

【識別番号】 591038945

【氏名又は名称】 村松 喬

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成11年特許願第256678号

【出願日】 平成11年 9月10日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 059101

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 早期癌腫瘍マーカー

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 MKポリペプチド又は該ポリペプチドと同一の抗原性を示すそのフラグメントからなる早期癌腫瘍マーカーを含む早期癌診断薬。

【請求項 2】 早期癌が胃癌である請求項 1 記載の早期癌診断薬。

【請求項 3】 胃癌がステージ 4 である請求項 2 に記載の診断薬。

【請求項 4】 早期癌が肝細胞癌である請求項 1 に記載の診断薬。

【請求項 5】 肝細胞癌がステージ 2 である請求項 4 に記載の診断薬。

【請求項 6】 MKポリペプチド又は該ポリペプチドと同一の抗原性を示すそのフラグメントの早期癌診断への使用。

【請求項 7】 MKポリペプチド又は該ポリペプチドと同一の抗原性を示すそのフラグメントを含む早期癌診断キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】

本発明は、早期癌の診断のための腫瘍マーカー、早期癌診断への該腫瘍マーカーの使用、及び体液中の該腫瘍マーカーを測定し、その測定値に基づいて早期癌を診断する癌の診断方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

癌の進展ないし拡大の程度は、早期癌、進行癌、末期癌と表現される。このうち早期癌とは“一般的に小さく、転移も少なく、治療によって永久ないし長期治療が得られる進行度の癌”として位置づけられる。

【0003】

早期癌の治療は、切除範囲が狭いために患者への侵襲が少なく、多くの場合は、臓器機能も維持され、生活の質（クオリティオブライフ，QOL）を損なうことが少ない。救命率も100%に近く、費用効果という点でも最も望ましい治療である。前癌病変にも予防的切除か切除できない病変は、ハイリスクとして濃密

なフォローアップによって早期に癌を発見し、延命をはかることができる。また、最近では、 β カロチン、レチノイド、インターフェロンなどによる予防的介入実験も開始されている。以上の理由から、早期癌と前癌病変を診断することは重要であり、このためのマーカー物質の意義も大きい。

【0004】

MKは、分子量13 kDaのヘパリン結合性成長因子で、塩基性アミノ酸とシステインに富む (Kadomatsu, K., et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 151: 1312-1318, 1988; Tomomura, M., et al.: *J. Biol. Chem.*, 265: 10765-10770, 1990)。MKと疾病との関連で最も興味をもたれるのは、癌との関連である。さまざまなヒト癌の多くで、MKの発現は、周辺の正常組織と比較して増強している (Tsutsui J. et al.: *Cancer Res.*, 53: 1281-1285, 1993; Aridome, k., *Cancer Res.*, 86: 655-661, 1995)。大腸癌、肝臓癌、膵臓癌、食道癌、胃癌などの消化器癌では、80～90%のケースでMKの発現の上昇が認められる (Aridome, k., *Cancer Res.*, 86: 655-661, 1995)。肺癌 (Garver, R.I., et al.: *Cell Mol. Biol.*, 9: 463-466, 1993)、乳癌 (Garver, R.I., et al.: *Cancer*, 74: 1584-159, 1994)などでも同様である。そして、ニューロblastoma (Nakagawara, A. et al.: *Cancer Res.*, 55: 1792-1797, 1995)、グリオーマ (Mishima, K. et al.: *Neurosci. Lett.*, 233: 29-32, 1997)、膀胱癌 (O'Brien, D., et al.: *Cancer Res.*, 56: 2515-2518, 1996)では、MKの発現が強い症例は、弱い症例よりも予後が悪い。

【0005】

Muramatsuらは、MKに対する高感度のELISAを開発し、肝臓癌患者の血清中のMKレベルを0.6～8 ng/mlのレンジ (range) で検出している (Muramatsu, H. et al.: *J. Biochem.*, 119: 1171-1175, 1996)。しかし、肝臓癌のステージとの相関は検討されていない。

【0006】

腫瘍マーカー検査は、現在日常の癌診療において不可欠のものである。現時点では、腫瘍マーカーの測定により、早期癌を診断することは困難であり、早期癌の状態から検出されうる癌特異的な物質の発見、検査法の開発が望まれている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、早期癌のマーカーとして利用できる新規なポリペプチドを提供することを課題とする。また、本発明は、該ポリペプチドを検出する免疫学的測定法を提供することを課題とする。さらに、本発明は、該ポリペプチドを検出することができる早期癌の体外診断薬を提供することを課題とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、肝癌患者において、抗MK抗体により検出されるMKレベルが、健常者や肝炎患者に比べ、肝癌の組織中だけでなく、血中や尿中においても、早いステージで有意に増大していることを見出した。さらに、胃癌のについても同様に早いステージで、血中や尿中のMKレベルが有意に増大することを見出した。そこで早期癌における血清腫瘍マーカーとして、MKは、これまでの血清腫瘍マーカーにはみられない感度と特異性とを有しており、その測定を酵素免疫測定法で行うことにより全自動化が可能で、早期癌の診断の補助として非常に期待できる。

【0009】

すなわち本発明は、

- (1) MKポリペプチド又は該ポリペプチドと同一の抗原性を示すそのフラグメントからなる早期癌腫瘍マーカーを含む早期癌診断薬、
 - (2) 早期癌が胃癌である(1)の早期癌診断薬、
 - (3) 胃癌がステージ4である(2)の診断薬、
 - (4) 早期癌が肝細胞癌である(1)の診断薬、
 - (5) 肝細胞癌がステージ2である(4)の診断薬、
 - (6) MKポリペプチド又は該ポリペプチドと同一の抗原性を示すそのフラグメントの早期癌診断への使用、
 - (7) MKポリペプチド又は該ポリペプチドと同一の抗原性を示すそのフラグメントを含む早期癌診断キット、
- からなる。

【0 0 1 0】

【発明の実施の形態】

本発明のMKポリペプチドは、後述するように、既存の腫瘍マーカーに比べて、癌の早いステージにおいて発現が高まり、一方癌の存在しない個人の場合においては、該ポリペプチドは検出されない。それ故に、該ポリペプチドは早期の診断、或いは進展を検出するためのマーカーとなり得ることが期待される。

そこで、該ポリペプチドに対する特異的抗MK抗体又はそのフラグメントは、早期癌の診断、或いは進展を検出できる。ここで、“MKポリペプチド”という用語は、全長MKタンパク質、及びその任意の長さのアミノ酸配列を有するMKの生物活性を有するフラグメントを含む。また、“生物学的サンプル”という用語は、血液、血清、尿、及びその他の分泌物を含む。早期癌の診断、或いは進展を検出するために、生物学的サンプル中のMKポリペプチドの測定は、抗MK抗体を用いた定量的免疫測定法により行うことができる。免疫測定法（イムノアッセイ）は、ラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ、フルオロイムノアッセイ、ルミネッセンスイムノアッセイ、スピンイムノアッセイ、免疫凝集測定法、ウェスタンブロット法等が挙げられるが、何れのアッセイも本発明に用いることができる。

【0 0 1 1】

抗体又はその断片は、ポリクローナル又はモノクローナルであってもよい。さらに、抗体は単鎖、キメラ、CDR-グラフト、又はヒト化されたものであってもよい。抗体はここに記載された方法及び当業者によく知られたその他の方法によって作製され得る。

【0 0 1 2】

生物学的サンプル中のマーカーを検出するために、該マーカーに対する特異的抗体を用いる様々なアッセイ系が当業者に知られている（例えば、Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988を参照）。好ましい態様において、生物学的サンプルからMKポリペプチドに結合しそれを抽出する固相支持体上に固相化された抗体の使用を含む。結合された

MKポリペプチドは、それから、標識された第二抗体を用いて検出される。適切な第二抗体は、抗体／ポリペプチド複合体に結合する抗体を含む。

【0013】

固相支持体は、当業者のそれらに知られている材料は何れも用いることができる。例えば、マイクロタイターウエル、ニトロセルロース、或いはその他の適切な膜であってもよい。また、支持体は、ビーズ又はディスク、例えば、ガラス、ファイバークラス、ラテックス、又はプラスチック材料、例えば、ポリスチレン、ポリビニルクロライドであってもよい。支持体は、また、マグネチック粒子、又は、例えば、米国特許No. 5,359,681に開示されているようにファイバーオプティックセンサーであってもよい。抗体は、当業者のそれらに知られている様々な技術を用いて固相支持体に固相化される。これらは、特許や科学文献に十分に記載されている。“固相化”という用語は、非共有結合的会合、例えば、吸着及び共有結合的接着の双方を意味する。好ましくは、マイクロタイタープレートのウエル又はメンブレンに対する吸着による。このようなケースにおいて、吸着は、適切なバッファー中で、適切な時間固相支持体とともに抗体を接触させることによって達成される。接触時間は、温度によって変わるが、代表的には、およそ1時間～1日である。一般に、プラスチックマイクロタイタープレートのウエル（例えば、ポリスチレン又はポリビニルクロライド）とおおよそ10 ng～10 μg、好ましくは、およそ100 ng～1 μgの抗体との接触が、十分な量の抗体の固相化に必要である。

【0014】

固相支持体に対する抗体の共有結合的接着は、当業者に公知の方法にしたがって実施できる（例えば、Pierce Immunotechnology Catalog and Handbook, 1991, at A12-A13参照）。

【0015】

一つの態様において、アッセイは2-抗体サンドイッチアッセイであってもよい。このアッセイは、最初、固相支持体、通常マイクロタイタープレートのウエルに固相化された抗体とサンプル中のポリペプチドが、該固相化抗体に結合することができるように、サンプルを接触させる。次に、未結合のサンプルを、固相

化ポリペプチド-抗体複合体から除き、そして該ポリペプチドの異なった部位に結合することができる第二の抗体を加える。固相上に結合して残っている第二抗体の量を特異的な標識に対して適切な方法を用いて測定する。

【0016】

さらに、いったん該抗体が上記記載のように支持体上に固相化されると、支持体上の残りのタンパク結合部位が一般的にはブロックされる。適切なブロッキング剤、例えば、ウシ血清アルブミン (BSA)、或いは Tween 20TM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) が当業者に公知である。次に、固相化抗体とサンプルとをインキュベートし、ポリペプチドと該抗体を結合させる。サンプルはインキュベーションに先立ち、適切な希釈剤、例えば、リン酸緩衝液 (PBS) で希釈する。一般に、適切な接触時間 (すなわち、インキュベーション時間) は、癌患者個人から得られるサンプル中のポリペプチドの存在を検出するに十分な期間である。好ましくは、接触時間は、多分、結合型の部分及び未結合型の遊離部分の間が平衡に達する時間の少なくとも約 95% が、結合のレベルを達成するに十分な時間である。当業者は、平衡に達するに必要な時間は、ある一定期間の時間を過ぎて起こる結合レベルをアッセイすることによって容易に決定できる。通常、室温においては、およそ約 30 分のインキュベーション時間で十分である。

【0017】

次に、未結合のサンプルを、適切なバッファー、例えば、0.1% Tween 20TM を含む PBS で支持体を洗浄することによって除く。次に、標識第二抗体を固相支持体に加える。好適な標識物質は、酵素 (例えば、ホースラディッシュパーオキシダーゼ)、基質、補因子 (cofactor)、阻害剤、色素、放射性核種 (放射性同位体)、発光物質、蛍光物質、及びビオチンを含む。標識物質に対する抗体の結合は、当業者に公知の標準法を用いて達成できる。

【0018】

次に、第二抗体は、結合したポリペプチドを検出するに十分な時間固相化抗体-ポリペプチド複合体とインキュベートする。適切な時間は、通常、ある一定期間の時間を過ぎて起こる結合レベルをアッセイすることによって決定される。次

に、未結合の第二抗体を除き、結合した第二抗体を標識物質を用いて検出する。標識物質を検出する方法は、標識物質の性質に依存する。放射性物質に対しては、一般に、シンチレーションカウント又はオートラジオグラフィ方法が適当である。分光学的方法は色素、発光物質、及び蛍光物質に対して用いることができる。ビオチンは、異なる標識物質（通常、放射性又は蛍光物質、又は酵素）に対してカップルしたアビジンを用いて検出する。酵素は、通常、基質の添加（一般に時間の特異的期間）、それに続く反応産物の分光学的又はその他の分析によって検出する。

【0019】

癌の存在又は不存在を決定するために、一般に、固相上に結合して残っている標識物質から検出されるシグナルと、予め決定しておいたカットオフ値に対応するシグナルとを比較する。一つの好適な態様において、カットオフ値は固相化抗体が、癌の存在しない患者からのサンプルとインキュベートするとき得られるシグナルの平均値である。通常、予め決定したカットオフ値の標準偏差の3倍のシグナルを生じるサンプルは、癌に対して陽性であると考えられる。カットオフ値は、健常者の測定値の分布の95%信頼区間（基準範囲）の上・下限値が用いられることが多い。しかし、基準範囲の設定では、病態の分布が一切考慮されていない。そこで、カットオフ値は、その検査で識別すべき病態を明確に定義し、それに基づいて、その疾患群と非疾患群を一定数集め、検査し、2群の測定値の分離度（検査の分別能）と有病率（検査が適用される状況）を考慮して決めるのが正しい。この方法によって決定されるカットオフ値より高いシグナルを生じるサンプルは癌に対して陽性と考えられる。

【0020】

関連ある態様において、アッセイは、抗体をニトロセルロースのようなメンブレン上に固相化したフロースルー（flow-through）又はストリップテスト型を用い実施できる。フロースルーテストにおいては、サンプルがメンブレンを通り抜けるとき、サンプル中のポリペプチドは固相化抗体に結合する。次に、該第二抗体を含む溶液がメンブレンを通り抜けるとき、標識した第二抗体が、抗体-ポリペプチド複合体に結合する。次に、結合した第二抗体を上記したように検出する

。ストリップテスト型においては、抗体が結合したメンブレンの一端をサンプルを含む溶液中に浸す。サンプルは、第二抗体を含む領域を通過するようにメンブレンを移動し固相化抗体のエリアに向かって移動する。固相化抗体のエリアにおける第二抗体の濃度が癌の存在を示す。代表的には、その部位における第二抗体の濃度は、視覚的に読みとることができるラインのような一つのパターンを生じる。このようなパターンが存在しない場合は陰性結果を示す。一般に、メンブレンに固相化される抗体の量は、視覚的に識別できるパターンを生じるように選択される。その場合、生物学的サンプルが、2抗体サンドイッチアッセイにおいて陽性シグナルを生じるに十分なポリペプチドのレベルを含む。好ましくは、メンブレン上に固相化される抗体の量は、およそ $25 \text{ ng} \sim 1 \mu\text{g}$ であり、さらに好ましくは、およそ $50 \text{ ng} \sim 500 \text{ ng}$ である。このようなテストは通常、非常に小さい量の生物学的サンプルで行う。

【0021】

勿論、他に多数のアッセイプロトコルが本発明の抗原或いは抗体とともに使用に対して好都合である。上記の記載はほんの例示的なものを意図している。

他の態様において、上記ポリペプチドは、癌の進展に対してのマーカーとして用いることができる。この態様において、癌診断に対して上記に記載したようなアッセイは、オーバータイムで行い、反応ポリペプチドのレベルの変化を評価する。例えば、該アッセイは、6ヶ月から1年の期間24-72時間ごとに行い、そしてその後必要に応じて行う。一般に、抗体によって検出されるポリペプチドがオーバータイムで増加する患者においては、癌は進展している。反対に、癌は、反応ポリペプチドのレベルが時間がたつにつれて一定のままか、或いは減少するかのどちらかの場合は、癌は進展していない。

【0022】

上記方法で使用する抗体は、当業者に公知の様々な技術によって作製することができる（例えば、Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988参照）。このような技術において、抗原ペプチドからなる免疫原が、まず、いろいろな動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ヤギ）に注射される。この段階でこの発明のポリペプチドが修飾な

しの免疫原として働くことができる。また、特に、比較的短いポリペプチドの場合、該ペプチドにウシ血清アルブミン (B S A) 又はヘモシアニン (keyhole limpet hemocyanin) のようなキャリアタンパク質を結合すると、優れた免疫応答が引き起こされる。免疫原を動物ホストに注射し、好ましくは、1つ又は2つ以上のブースター免疫感作を含めるスケジュールにしたがって注射し、間をおいて採血する。次に、該ポリペプチドに特異的なポリクローナル抗体は、例えば、適当な固相支持体にカップルされたポリペプチドを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって精製する。

【0023】

本発明の抗原ペプチドに対する特異的モノクローナル抗体は、例えば、Kohler 及びMilsteinの技術 (Eur. J. Immunol. 6: 511-519, 1976) 及びその改良技術を用いて作製できる。要するに、これらの方法は、必要とされる特異性（すなわち、本発明のポリペプチドとの反応性）を有する抗体を産生することができる不死化したセルラインの調製を含む。このようなセルラインは、例えば、上記に記載したように、免疫した動物から得られる脾細胞から産生することができる。次に、脾細胞は、例えば、ミエローマ細胞を融合パートナー、好ましくは、免疫した動物と同系のパートナーとの融合によって不死化される。様々な融合技術を用いることができる。例えば、脾細胞とミエローマ細胞を数分間非イオン性界面活性剤と混合し、次に、ハイブリッド細胞の増殖は可能だがミエローマ細胞の増殖は不可能な選択培地の上に低密度でプレートする。好ましい選択技術は、H A T (hypoxanthin, aminopterin, thymidine) である。十分な時間、通常およそ1～2週間の後、ハイブリッドのコロニーが観察される。単一のコロニーを選択し、ポリペプチドに対する結合活性をテストする。高い反応性と特異性を有するハイブリドーマが好ましい。

【0024】

モノクローナル抗体は増殖しているハイブリドーマコロニーの上清から単離される。さらに、様々な技術、例えば、マウスのような適当な脊椎動物ホストの腹腔中にハイブリドーマセルラインを注入して産生を増強する。コンタミナントは、クロマトグラフィー、ゲル濾過、沈降、及び抽出のような通常技術によって除

くことができる。

【0 0 2 5】

癌の肉眼的進展度による分類として、TNM分類 (tumor-node-metastasis staging) が国際的に広く用いられているが、本発明で用いられる“ステージ分類”は、TNM分類に対応している〔臨床・病理 原発性肝癌取り扱い規約：22p. 日本肝癌学研究会編(改訂第3版)，金原出版，1992〕。

【0 0 2 6】

【実施例】

以下、本発明を実施例及び試験例により説明するが、本発明はこれらの具体例に限定されるものではない。

【0 0 2 7】

【実施例 1】 抗ヒトMKポリクローナル抗体の作製

免疫に用いるMKタンパク質、及び標準物質 (standard material) として用いる組換えMKタンパク質 (以下、「MK」とも称する) は、特開平9-95454の実施例 1 に記載されている方法に準じて作製した。

【0 0 2 8】

ピキア酵母を宿主とする発現ベクターPHIL-D4に、ヒトMKのORFをカバーするcDNAを導入した。このMK発現ベクターを、ピキア酵母G115 (ピキアパストリス G115; Research Corporation Technologies) にトランスフェクションした。ヒスチジン及びG418選択によりMK発現クローンを得た。MKは、イオン交換クロマトグラフィー及びヘパリンカラムによるアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。精製MKタンパクの神経栄養活性は、L細胞が産生したマウスMKのそれと類似していた。

【0 0 2 9】

ウサギ、及びニワトリに対する免疫注射は、ウサギの場合は、2週間おきに計6回、ニワトリの場合は、2週間おきに計8回行った。

【0 0 3 0】

すなわち、ウサギの場合は、初回に、400 μ gのMKをフロイント完全アジュバントと等量混合したものを、ウサギの皮下に注射し、2回目以降は、1回あたり

400 μ gのMKをフロイント不完全アジュバントと混合したものを皮下に注射した。ニワトリの場合は、1回あたり100 μ gのMKを用いニワトリに注射した他は、ウサギと同様であった。

【0031】

ウサギから得た抗血清は、硫酸で塩析した後、プロテインAカラムでIgGを単離し、さらに、MKをAffigel-10TM (Bio Rad) に固定化したMKアフィニティカラムにより、アフィニティ精製して、精製ウサギ抗MK特異的抗体を得た。一方、ニワトリから得た抗血清は、硫酸で塩析の後、MKアフィニティカラムでアフィニティ精製して、精製ニワトリ抗MK特異的抗体を得た。これらの抗体は、ウエスタンブロット解析でヒトMKを特異的に検出した。

【0032】

【実施例2】 1-ステップサンドイッチ法によるMKの測定

ウサギ抗MK抗体を、0.1% NaN₃を含む50 mM PBS (pH 7.2) に溶解 (5.5 μ g/ml) し、その50 μ lを、マイクロタイタープレート (Polysorp plates, Nunc) の各ウェルに分注した。室温で16時間抗体を吸着させた。0.1% Tween 20を含むPBSで洗浄後、0.5% BSAを含むPBS 150 μ lを各ウェルに加え、37℃で2時間ブロックキングした。一方、肝癌及び腺癌血清サンプル、あるいは健常人血清サンプル (コントロール) 各々10 μ lは、0.5 M KCl、0.5% ウシ血清アルブミン (BSA)、0.01% Microcide I (aMReSCO, Solon, Ohio) 含む50 mM Tris-HCl (pH 8.4) に溶解したペルオキシダーゼ標識ニワトリ抗ヒトMK抗体 (0.1 μ g/ml) 100 μ lと反応させた。この反応液50 μ lを、マイクロタイタープレートの各ウェルに加え、室温で1時間インキュベーションした。各ウェルを、1% Tween 20を含むPBSで5回洗浄した。基質溶液 (0.5mg/mlのtetramethylbenzidine) 100 μ lを各ウェルに加え、室温で30分間インキュベートした。2N-H₂SO₄を加えて反応を停止し、450 nmにおける吸光度をmultiplate reader (Model 3550, BioRad) を用いて測定した。

【0033】

【試験例1】 肝癌の早期ステージに対するMKの血清マーカーとしての有用性

(1) 血清サンプルの調製

健常者 135 名（男性：94 名、女性：41 名；年齢 21～75）、ステージ 1～4 の肝癌患者 72 名（ステージ 1：7 名、ステージ 2：19 名、ステージ 3：23 名、及び 4：27 名）及びウイルス肝炎患者 7 名、ステージ 1～7 の腺癌患者 72 名（ステージ 1：23 名、ステージ 2：9 名、ステージ 3：7 名、ステージ 4：9 名、ステージ 5：5 名、ステージ 6：9 名、及びステージ 7：10 名）、から採血し血清を調製した。血清は直ちに凍結し、アッセイまで、 -20°C で保存した。

【0034】

(2) 肝癌ステージと血清中 MK ポリペプチドとの関係

肝癌 (hepatocellular carcinoma: HCC) の各ステージと、該ステージにおける血清中の MK のポリペプチドとの相関を調べた。

肝癌の各ステージ (1～4)、肝疾患対照としてウイルス肝炎患者、及び正常値として健常人、のそれぞれの血清中の MK ポリペプチドを、実施例 2 の 1-ステップサンドイッチ法で測定した。結果を図 1 に示す ($p < 0.01$; 統計ソフト; StatView-J5.0 を使用)。バーは標準偏差を示す。肝癌患者の血清中の MK ポリペプチドは、肝癌ステージ 2 から、健常者のそれよりも有意に高くなっていることが認められる。

【0035】

肝癌ステージと血清 MK ポリペプチドとの相関を回帰分析すると、図 2 の相関図に示すように直線回帰となる。 $n = 64$ で、相関係数 $R = 0.612$ と、ステージの大きさと血清中 MK ポリペプチドとの間には、かなり強い相関が認められる。

【0036】

(3) PIVKA-II 及び AFP との比較試験、

肝癌の腫瘍マーカーには、AFP、PIVKA-II、novel γ -GTP、variant ALP などがあるが、これらの中で、現在、優れた肝癌のマーカーとして使用されている AFP と PIVKA-II を比較対照に選んだ。PIVKA-II は肝癌に特異的であり、AFP は肝疾患の程度に特異的である、と言われている。そこで、上記血清サンプルを用いて、該サンプル中の PIVKA-II 及び AFP ポリペプチドを測定した。

【0037】

血清中のPIVKA-IIは、エイテストPIVKA-II（三光純薬株式会社）を用いて測定した。測定方法は、酵素免疫測定法（EIA）である。結果を図3（図中バーは標準誤差を示す）に示す。図3より、肝癌ステージ3から陽性と診断される可能性が示唆されるが、各ステージの標準偏差が大きく、ステージ間の測定値に有意な差を認めることはできない。

【0038】

血清中のAFPポリペプチドは、 α -フェト・リアビーズ（ダイナボット社）を用いて測定した。測定方法は、イムノラジオメトリックアッセイ（IRMA）である。結果を図4（図中のバーは標準誤差を示す）に示す。AFPは、肝癌ステージ1では検出されず、ステージ2から初めて検出されることが認められる。しかも各ステージでの標準偏差が大きく、ステージ毎の値の特異性が確認できない。AFPは、肝癌の早期ステージでのAFP値の上昇（反応物質の単位量当たりの応答変動：感度）が小さいため、早期癌の診断には使用されていない（ステージ3以上より健常者と比較して有意に上昇するものがあるといわれている）。また、AFPは、肝癌への特異性はそれほど高くはなく、そのためにPIVKA-IIとのセットで、肝癌を検査することが多い。

【0039】

すなわち、MKは、肝癌の血清腫瘍マーカーとして、PIVKA-IIやAFPよりも早いステージの肝癌の検出が可能であり、また、肝癌のステージと血清中のMK濃度上昇との間には強い相関関係が認められた。

【0040】

早期の肝癌ステージの血清MKポリペプチドの値をおさえておけば、肝癌を疑ってきた患者に対して、次の適切な処置に進める大きな目安になる。また、肝癌を切除した患者の再発モニターとしてもMKは非常に有効である。血清中のPIVKA-IIやAFPの挙動とMKは相関しないというデータ（***）もあるので、MKは、肝癌を早期に診断する血清マーカーとして期待できる。

【0041】

〔試験例2〕 胃癌の早期ステージに対するMKの血清マーカーとしての有用性

(1) 血清サンプルの調製

ステージ 1 ～ 7 の腺癌患者 7 2 名（ステージ 1 : 2 3 名、ステージ 2 : 9 名、ステージ 3 : 7 名、ステージ 4 : 9 名、ステージ 5 : 5 名、ステージ 6 : 9 名、及びステージ 7 : 1 0 名）、から採血し血清を調製した。血清は直ちに凍結し、アッセイまで、 -20°C で保存した。なお、健常者血清は試験例 1 のものを用いた。

【0 0 4 2】

(2) MK と胃癌ステージとの関係

胃癌患者の各ステージの血清中の MK ポリペプチドを実施例 2 の 1 - ステップ サンドイッチ法で測定した。結果を図 5 に示す（図中バーは標準偏差を示す）。ステージ 4 から、血清中の MK 濃度が有意 ($p < 0.01$; 統計ソフト ; StatView-J5.0 を使用) に高くなっていることが認められる。ステージの変化と血清 MK ポリペプチドとの相関を回帰分析すると、図 6 の相関図に示すように直線回帰となる。 $n = 58$ で、相関係数 $R = 0.74$ と、ステージの大きさと血清 MK ポリペプチドの間には、強い相関があるといえる。

【0 0 4 3】

胃癌のステージ 4 以降は、手術不可といわれ、ステージ 4 までの早期に、癌を発見できるかどうか、その後の予後を決定づけるとされている。

【0 0 4 4】

(3) CEA 及び CA 1 9 - 9 との比較試験

比較対照の腫瘍マーカーとして、CEA（癌胎児性抗原 ; carcino-embryonic antigen）、及び CA 1 9 - 9 を選んだ。CEA は、肺癌、乳癌、大腸癌、胃癌、甲状腺髄様癌などの進行期に、高率に陽性となると報告されている。CA 1 9 - 9 は、膵癌、胆道系癌で高値を示すといわれている。

【0 0 4 5】

血清中の CEA ポリペプチドを CEA リアビーズ（ダイナボット社）を用いて測定した。測定方法は、IRMA である。結果を図 7 に示す（図中のバーは標準誤差を示す）。CEA は、ステージ 7 から陽性と診断される可能性が示唆されるが、各ステージでの標準偏差が大きく、ステージ間での有意差が認められない。

【0046】

血清中のCA19-9は、セントコアCA19-9RIAキット（Centocor社；正常値：37U/ml以下、）を用いて測定した。測定方法は、IRMAである。結果を図8に示す（図中バーは標準誤差を示す）。CA19-9は、ステージ5でのみ高値を示しているため、ステージとの相関性は期待できないと推測される。

【0047】

すなわち、腺癌の血清腫瘍マーカーとして、MKは、CEAやCA19-9よりも早いステージの腺癌の検出が可能であり、また、胃癌のステージと血清中のMK濃度上昇との間には強い相関関係が認められる。

【0048】

癌には多段階発癌という考え方があり、例えば腺癌の一つ、膵癌でも検討されている（Molecular Medicine, vol 36, No.4, 1999, p434-439）。多段階の発癌過程で、多くの癌に関連していると考えられている因子が発現してくることが確認されている。すなわち、K-ras, p53, c-jun, TGF- α , テロメラーゼ活性などである。しかし、ここでも、MKの出現は早く、癌の発生段階の初期に出現することがわかる。

【0049】

ステージ4以降は、転移等が激しく、外科的な手術で対応することが困難であり、そのため、治療が、投薬、放射線等の治療に限定される。その結果、患者の「Quality of life」は著しく低下し、また平均余命も極端に短くなる傾向にある。つまり、癌全般に言われていることではあるが、早期に癌を発見することの重要性は、まさしくここにあると言える。患者の「Quality of life」を考えることは、国民医療費を考えることにも繋がると考えられる。早期に癌を発見し、直ちに適切な処置を行うことで、そうしない場合に発生する医療費を抑えることにもなる。

【0050】

〔試験例3〕 癌患者尿中のMKポリペプチドの測定

癌患者尿（胃癌：24名、肝細胞癌：24名、大腸癌：24名）72検体、及び健常人の人間ドック時における早朝尿50検体中のMKポリペプチドを測定し

た。また、同じ尿中のクレアチニン値を測定し、クレアチニン値でMKの値を補正した。結果を図9に示す。健常人と癌患者の尿中MK値の間に有意差 ($p < 0.0001$; Mann-WhitneyのU検定) が認められた。

【0051】

〔試験例4〕 癌患者の尿中MK値と癌のステージとの関係

癌患者の尿中MK値が癌のステージとの関係を調べた。

胆管癌 (bile duct) 3名、乳癌 (breast) 3名、大腸癌 (colon) 6名、食道癌 (esophagus) 3名、胆嚢癌 (gall bladder) 1名、肝癌 (HCC) 10名、膵臓癌 (pancreas) 3名、直腸癌 (rectum) 7名、胃癌 (stomach) 28名、甲状腺癌 (thyroid) 1名、の計65名について、ステージ分け (stage1~7) を行い、尿中MKポリペプチドを実施例2の1-ステップサンドイッチ法で測定した。ステージ毎の測定値の分布を図10に示した。各ステージは、健常人よりも高い値を示した。これまで、尿中の腫瘍マーカーとして定されたものは、例えば、CEA (Carcinoembryonic Antigen、癌胎児性抗原) がある (in vivo 9:311-314(1995)、日本臨床34巻6号 (6,1976))。しかし、未だ尿中の腫瘍マーカーを測定して、癌の早期ステージに関する情報が得られたマーカーは報告されていない。今回、尿中MKポリペプチドにおいて、癌のステージに関する情報を得られる知見が示唆された意義は非常に大きいと考えられる。

【0052】

【発明の効果】

本発明により、早期癌の補助診断に有用な血清腫瘍マーカーが提供された。該腫瘍マーカーは、早期癌のスクリーニング、ステージと予後の推定、治療経過のモニタリングとして有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】 肝癌の各ステージ (1~4)、肝疾患対照として、ウイルス肝炎患者、及び正常値として健常者、それぞれの血清中のMKポリペプチドを、1-ステップサンドイッチ法で測定した図である。エラーバーは標準偏差を示す (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)。

【図2】 肝癌の各ステージ (1~4) の変化と、血清中のMKポリペプチ

ドとの相関を回帰分析した図である

【図3】 肝癌の各ステージ（1～4）の血清中のAFPポリペプチドを、 α -フェト・リアビーズ（ダイナボット社）を用いて測定した図である。エラーバーは標準誤差を示す。

【図4】 肝癌の各ステージ（1～4）の血清中のPIVKA-IIポリペプチドを、エイテストPIVKA-II（三光純薬株式会社）を用いて測定した図である。エラーバーは標準誤差を示す。

【図5】 胃癌の各ステージ（1～7）、及び健常者のそれぞれの血清中のMKポリペプチドを1-ステップサンドイッチ法で測定した図である。エラーバーは標準偏差を示す（*： $p<0.05$, **： $p<0.01$ ）。

【図6】 胃癌の各ステージ（1～7）の変化と、血清中のMKポリペプチドとの相関を回帰分析した図である

【図7】 胃癌の各ステージ（1～7）の血清中のCEAポリペプチドを、CEAリアビーズ（IRMA法）（ダイナボット社）を用いて測定した図である。エラーバーは標準誤差を示す。

【図8】 胃癌の各ステージ（1～7）の血清中のCA19-9ポリペプチドを、セントコアCA19-9RIAキット（IRMA法）（Centocor社）を用いて測定した図である。エラーバーは標準誤差を示す。

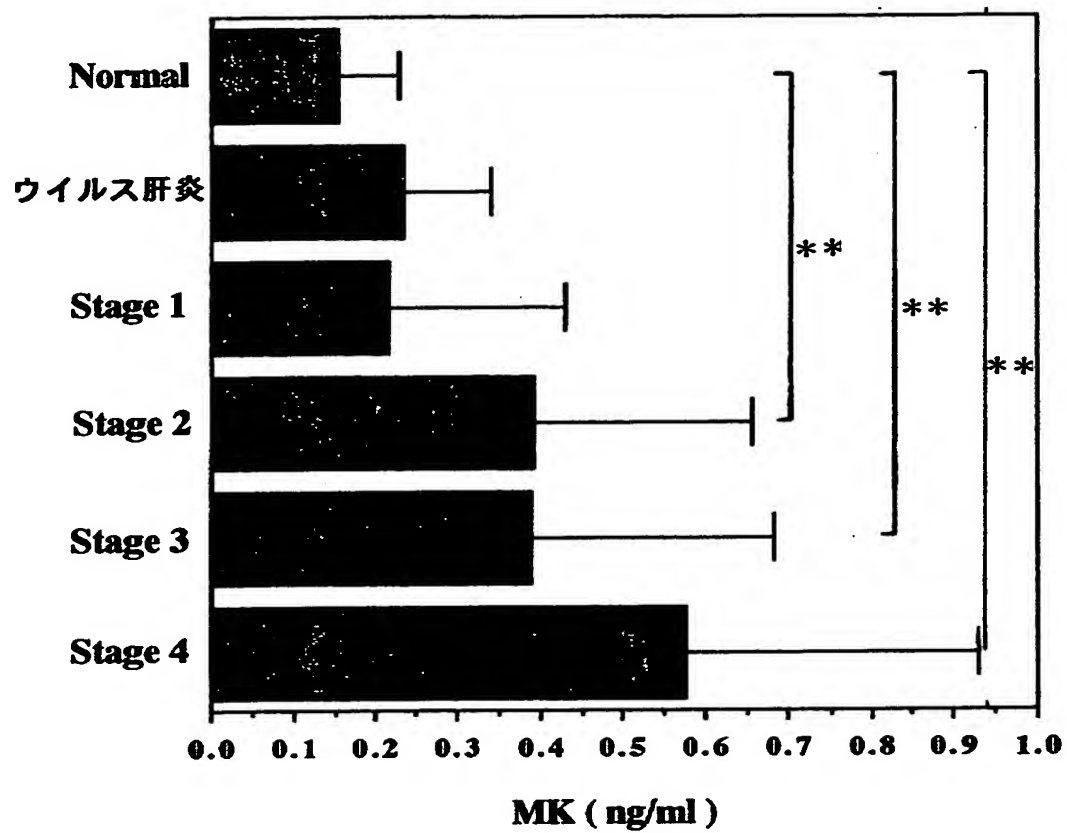
【図9】 癌患者尿（胃癌：24名、肝細胞癌：24名、大腸癌：24名）72検体、及び健常人の尿50検体中のMKポリペプチドを示す（クレアチニン値で補正）（ $p<0.0001$ ；Mann-WhitneyのU検定）。

【図10】 癌患者の尿中MK値と癌のステージとの関係を調べた。

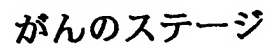
胆管癌（bile duct）3名、乳癌（breast）3名、大腸癌（colon）6名、食道癌（esophagus）3名、胆嚢癌（gall bladder）1名、肝癌（HCC）10名、膵臓癌（pancreas）3名、直腸癌（rectum）7名、胃癌（stomach）28名、甲状腺癌（thyroid）1名、の計65名の各ステージ（stage1～7）におけるMKポリペプチドを示す（*： $p<0.05$, **： $p<0.01$ ）。

【書類名】図面

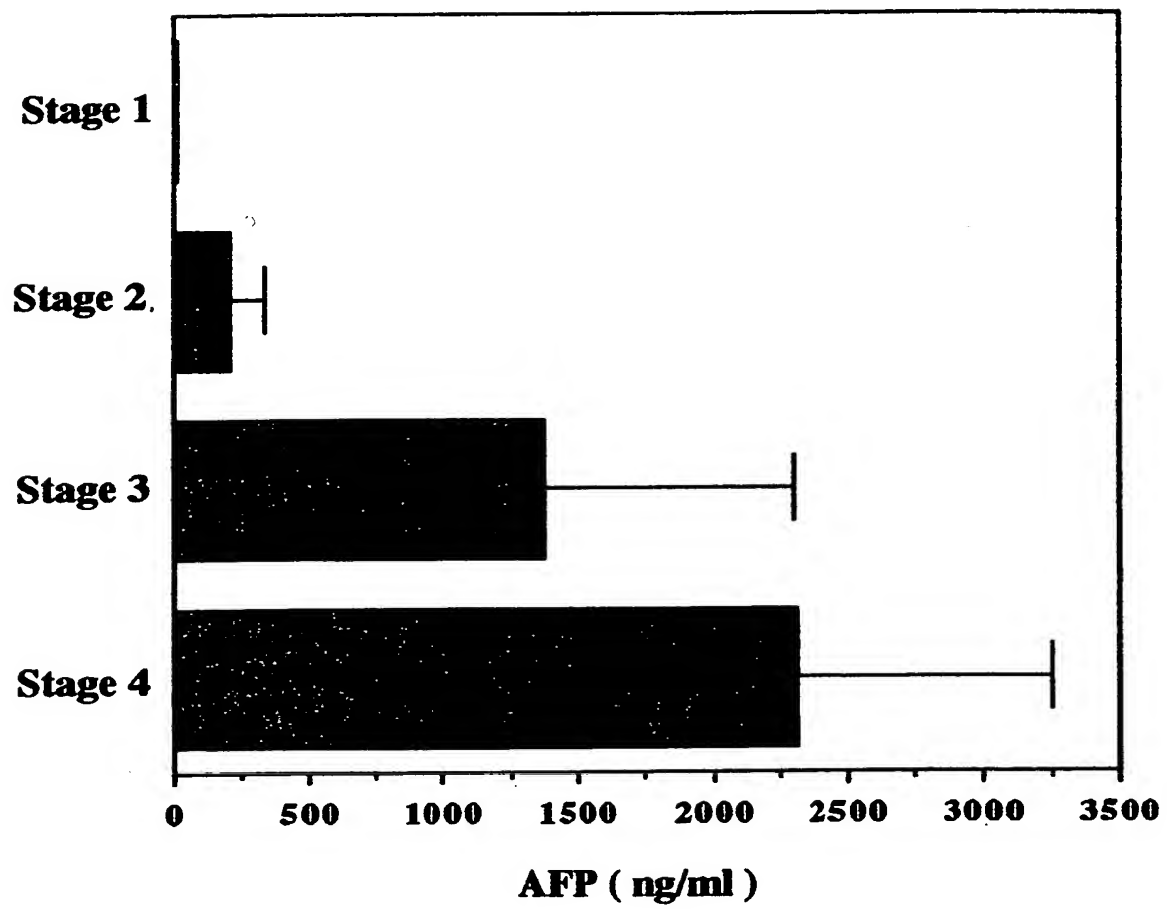
【図 1】



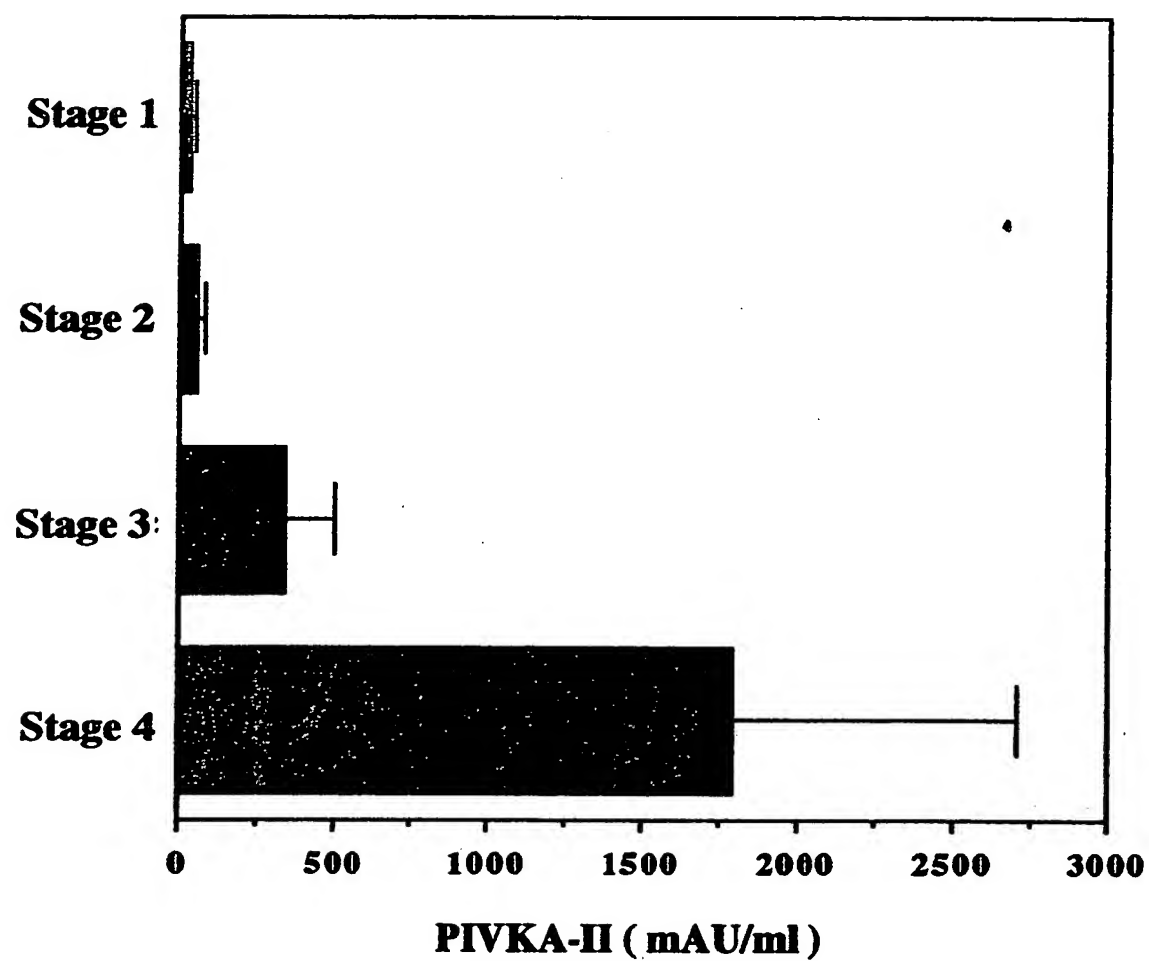
MK (ng/ml)



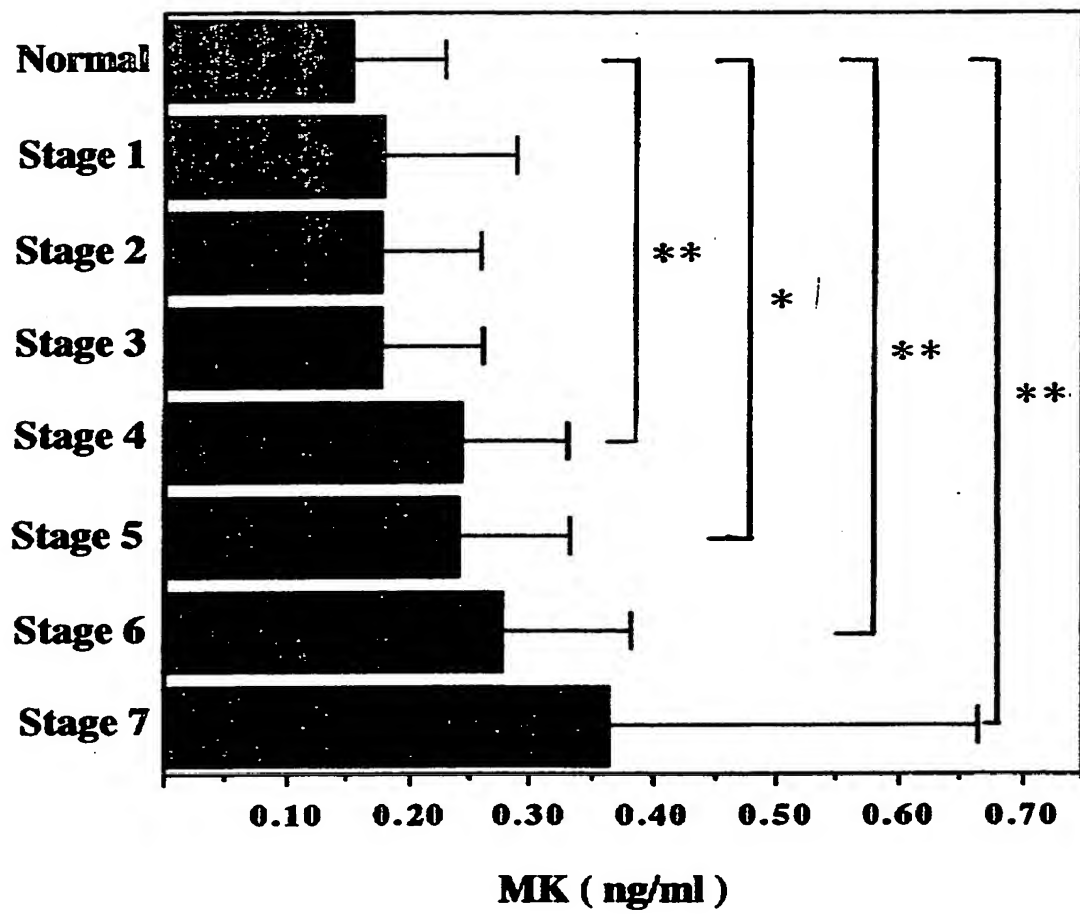
【図 3】



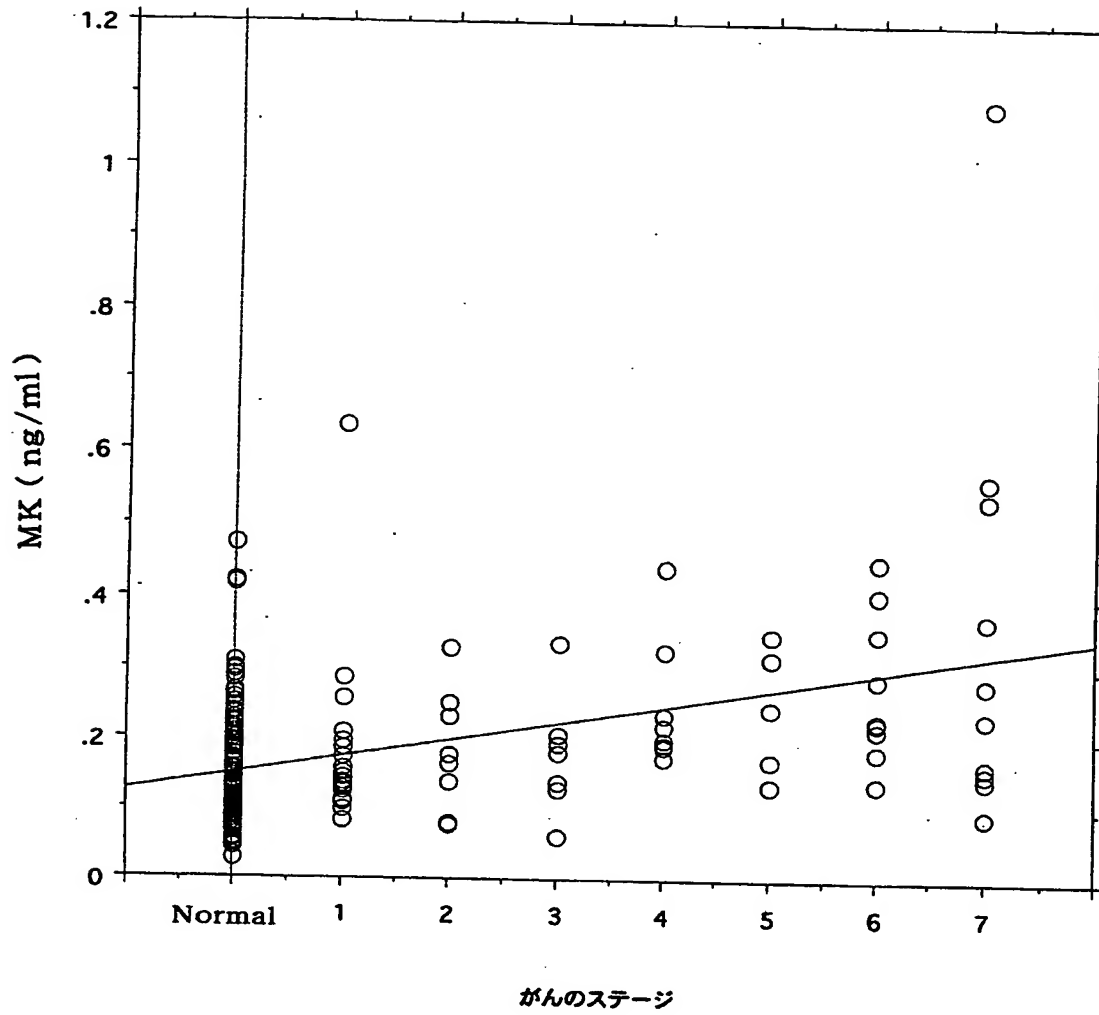
【図 4】



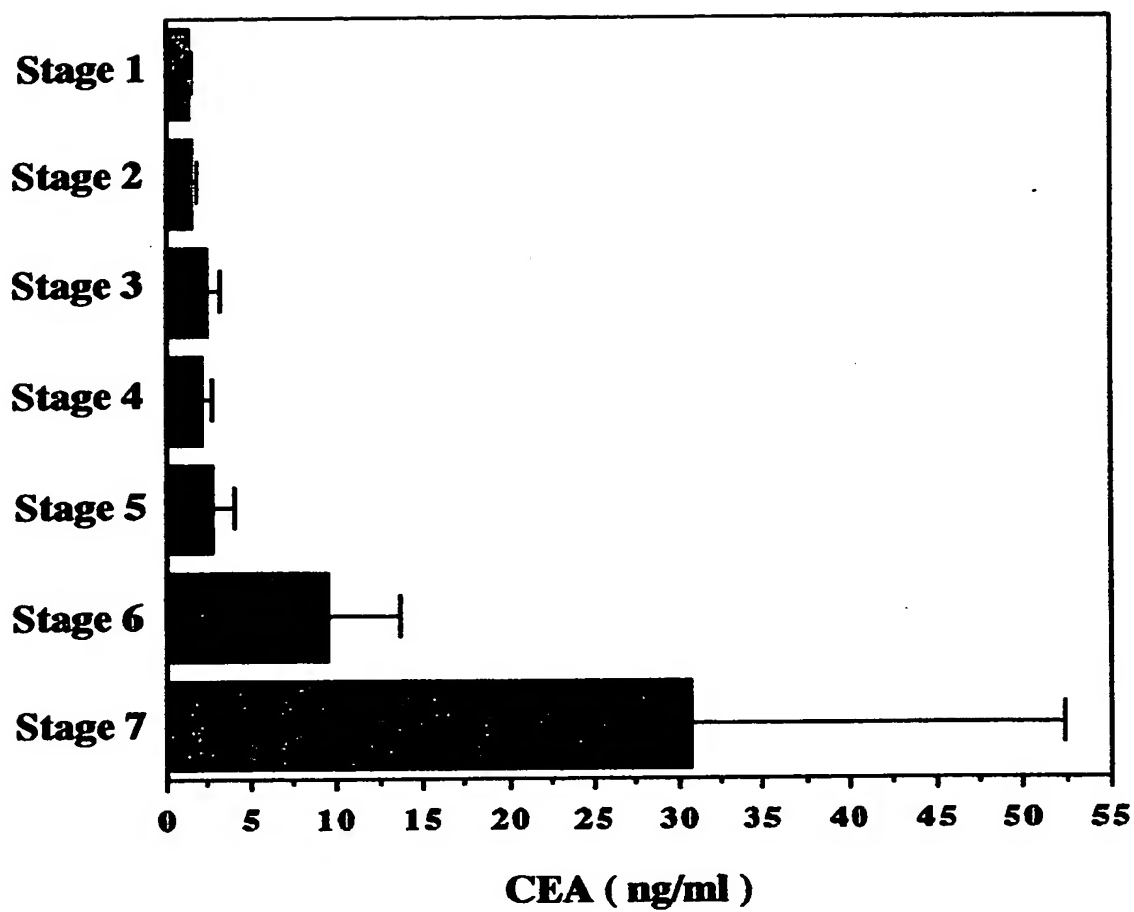
【図 5】



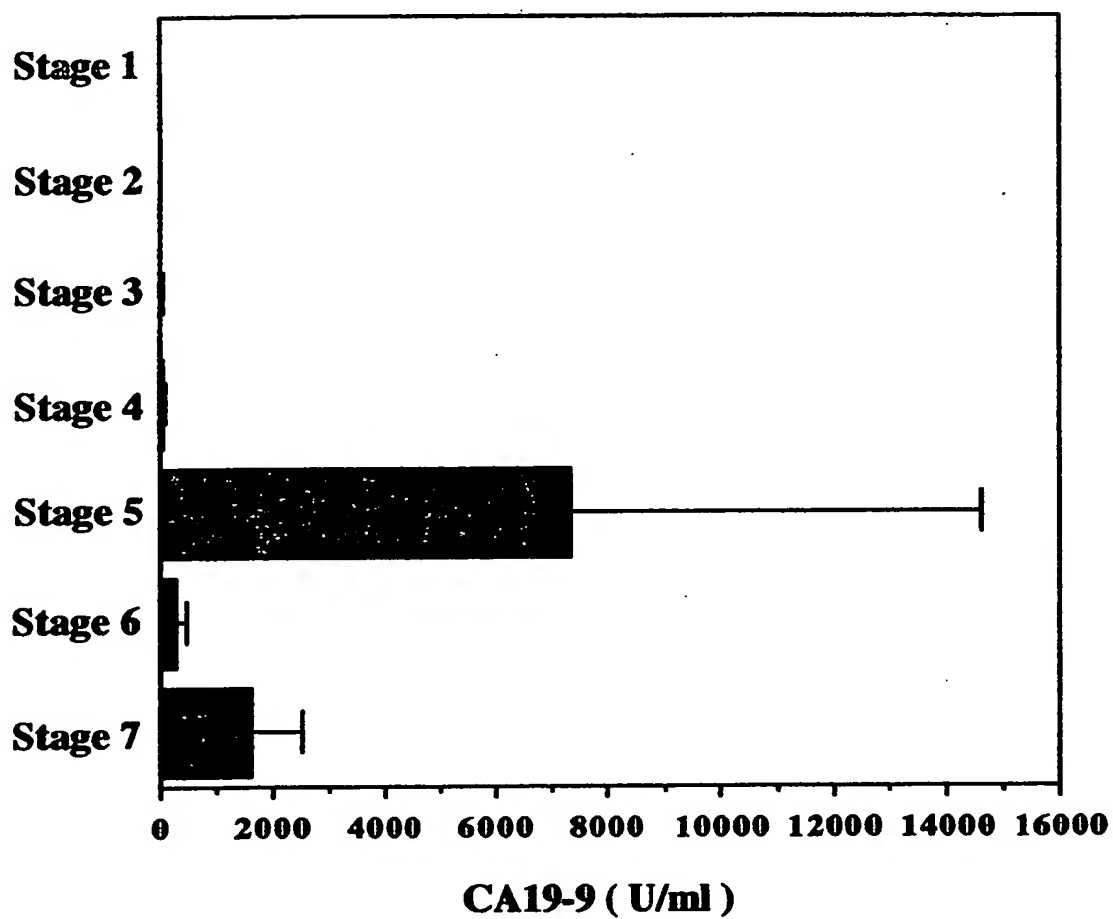
【図 6】



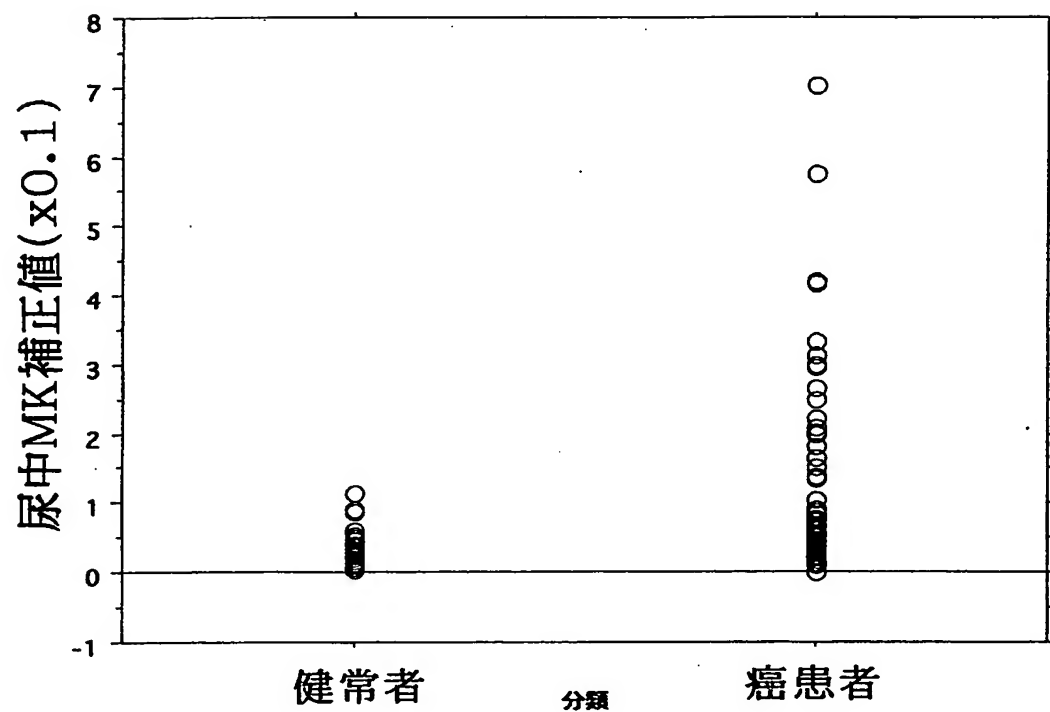
【図 7】



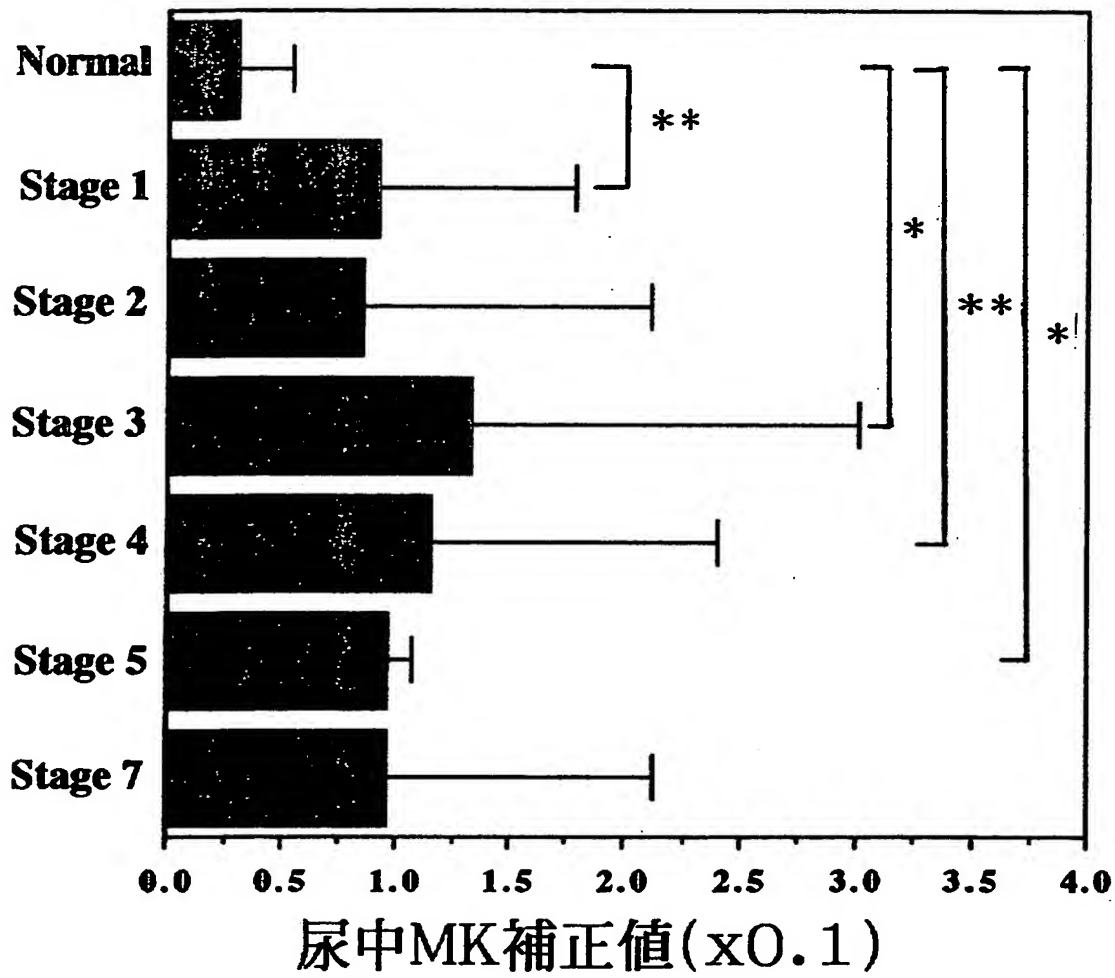
【図 8】



【図 9】



【図10】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 早期癌を診断するための血清腫瘍マーカー、及び該マーカーを用いた早期癌の診断方法を提供することを課題とする。

【解決手段】 癌患者の生物学的サンプル中には早いステージでMKポリペプチドが出現し、該患者のステージと、該ポリペプチドとの間には強い相関があり、生物学的サンプル中のMKポリペプチドを、早いステージで、エンザイムイムノアッセイにより検出することにより、早期癌を診断しうることを見出した。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第345404号
受付番号	59901184607
書類名	特許願
担当官	内山 晴美 7545
作成日	平成12年 2月16日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】	申請人
【識別番号】	000006138
【住所又は居所】	東京都中央区京橋2丁目3番6号
【氏名又は名称】	明治乳業株式会社
【特許出願人】	
【識別番号】	591038945
【住所又は居所】	愛知県名古屋市天白区天白町大字平針字黒石28 45-161
【氏名又は名称】	村松 喬

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000006138]

1. 変更年月日	1990年 8月14日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都中央区京橋2丁目3番6号
氏 名	明治乳業株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [591038945]

1. 変更年月日 1996年 9月26日

[変更理由] 住所変更

住 所 愛知県名古屋市天白区天白町大字平針字黒石2845-161

氏 名 村松 喬